

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-23896

(43)公開日 平成10年(1998)1月27日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09	Z NA	9282-4B	C 12 N 15/00	Z NAA
C 07 H 21/04			C 07 H 21/04	B
C 12 N 1/21			C 12 N 1/21	
9/04			9/04	Z
C 12 P 13/04			C 12 P 13/04	

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全13頁) 最終頁に続く

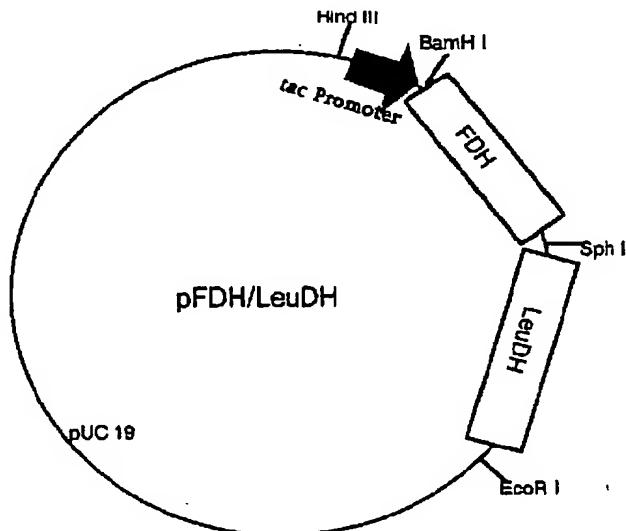
(21)出願番号	特願平8-217060	(71)出願人	000004503 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地
(22)出願日	平成8年(1996)8月19日	(72)発明者	左右田 健次 京都府宇治市木幡御蔵山45-61
(31)優先権主張番号	特願平8-112303	(72)発明者	江崎 信芳 滋賀県大津市黒津2丁目21-12
(32)優先日	平8(1996)5月7日	(72)発明者	アンドレ ガルキン 京都府京都市伏見区西ノ坪1 醍醐石田園 地1-506
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

(54)【発明の名称】組換えプラスミド、それにより形質転換された大腸菌、その培養物及びそれを用いたアミノ酸又はその誘導体の製造方法

(57)【要約】

【課題】アミノ酸及びその誘導体を容易に製造するために用いることのできる組換えプラスミド、それにより形質転換された大腸菌及びそれを用いたアミノ酸又はその誘導体の製造方法を提供する。

【解決手段】NAD⁺依存性ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子と、NADH依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを含有してなる組換えプラスミド。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 NAD⁺依存性ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子と、NADH依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを含有してなる組換えプラスミド。

【請求項2】 請求項1記載の組換えプラスミドで形質転換された大腸菌。

【請求項3】 請求項2記載の大腸菌を培養して得た培養物。

【請求項4】 請求項3記載の培養物の存在下に、 α -ケト酸とギ酸アンモニウムとを反応させることを特徴とするアミノ酸又はその誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ギ酸デヒドロゲナーゼを用いた共役反応に利用される組換えプラスミド、それにより形質転換された大腸菌、その培養物及びそれを用いたアミノ酸又はその誘導体の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、アミノ酸及び天然には存在しないその誘導体を製造する一つの方法として、 α -ケト酸、アンモニウム塩及び補酵素NADHをアミノ酸デヒドロゲナーゼに作用させることにより製造する方法がある。このようなNADHが関与する酵素反応は工業的製造方法に適用するために、NAD⁺を元のNADHに再生するための反応と共にさせた形で行われている。しかし、通常のNAD⁺依存性デヒドロゲナーゼを用いた共役反応においては、反応液中に少なくとも2系列の生成物が存在することになり、その分離がきわめて難しいという問題点があった。そこで、NAD⁺依存性デヒドロゲナーゼとして、ギ酸デヒドロゲナーゼを用いて共役反応を行う方法が提案されている（特公平7-59198号公報）。この方法によれば、共役反応を充分進行させることにより、原料のギ酸アンモニウムが殆ど残存せず、さらに、ギ酸から生成する二酸化炭素は気体として反応系外に散逸するので、反応液中にはNADH依存性酵素による生成物のみが残り、その分離が非常に容易であるという利点がある。

【0003】一方、特公平5-32024号公報には、バチレス由來の耐熱性のL-アラニン脱水素酵素の遺伝子を有するプラスミドで形質転換された大腸菌が開示されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、NADH依存性酵素による目的生成物合成反応とギ酸デヒドロゲナーゼによる補酵素の再生産を効率良く行うためには、それぞれの酵素をそれぞれの供給源から反応液中に添加しなければならないため、繁雑な精製工程が必要であるという問題点があった。本発明は、アミノ酸又はその誘導体

を容易に製造するために用いることのできる組換えプラスミド、それにより形質転換された大腸菌及びその培養物を提供することを目的とするものである。また、本発明は、アミノ酸又はその誘導体を容易に効率よく製造することができるアミノ酸又はその誘導体の製造方法を提供することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、このような課題を解決するために銳意検討の結果、NAD⁺依存性ギ酸デヒドロゲナーゼ及びNADH依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼの遺伝子を有する組換えプラスミドにより形質転換された大腸菌から得られた培養物を用いることにより、容易にアミノ酸及び天然に存在しないアミノ酸誘導体を製造することができるということを見い出し、本発明に到達した。すなわち、第一の発明は、NAD⁺依存性ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子と、NADH依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを含有してなる組換えプラスミドを要旨とするものである。また、第二の発明は、上記の組換えプラスミドで形質転換された大腸菌を要旨とするものである。さらに、第三の発明は、上記の大腸菌を培養して得た培養物を要旨とするものである。また、第四の発明は、上記の培養物の存在下に、 α -ケト酸とギ酸アンモニウムとを反応させることを特徴とするアミノ酸又はその誘導体の製造方法を要旨とするものである。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の組換えプラスミドは、NAD⁺依存性ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子と、NADH依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを含有しており、これらの遺伝子はプロモーターの下流に同一転写方向に組込まれている。

【0007】本発明に用いられるNAD⁺依存性ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子としては、マイコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) 由來の遺伝子が挙げられ、具体的には、マイコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) N10株由來の遺伝子が挙げられる。

【0008】このような微生物からギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子をクローニングする方法としては、例えば、シードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) 由來のギ酸デヒドロゲナーゼの保存領域のアミノ酸配列〔バイオケミカル アンド バイオフィジカルリサーチ コミュニケーション (Biochemical and Biophysical Research Communication), Vol.192, No.2; 976-981(1993)〕に基づき、プライマーを設計、合成し、このプライマーを用いてPCR反応を行い、DNA断片を増幅させる。次に、増幅させたDNA断片の塩基配列を決定し、当初に設定したアミノ酸配列をコードしていることを確認した後、このDNA断片をプローブとして、ギ酸デヒドロゲナーゼ遺

伝子を含む染色体DNAの制限酵素切断産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行えばよい。このとき、目的とするキ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片のおおよその大きさを2~3Kbpに限定することが好ましい。

【0009】このようにして得られたマイコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) N10株由来のキ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片を組み込んだプラスミドの一例がpFDHである。このプラスミドpFDHを保有するエシェリチア・コリJM109 (pFDH)株は、平成7年12月18日付けて、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。その寄託番号は、FERM P-15352である。

【0010】本発明においてクローニングしたマイコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) N10株由来のキ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子は1200塩基対(推定アミノ酸400個)から構成されている。また、本発明に用いられるNADH依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子としては、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のアラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子、サーモアクチノミセス・インターミディアス (*Thermoactinomyces intermedius*) 由来のロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子等が挙げられる。

【0011】これらの遺伝子をクローニングする方法としては、これらの遺伝子をコードする染色体DNAを制限酵素で処理したものとプラスミドに挿入し、このプラスミドによって形質転換された大腸菌を直接酵素源として用いるか、あるいはリゾームなどで溶菌し、得られた細胞内容物を用いて酵素活性を測定する直接活性発現を指標とした検索により行うことができる。

【0012】このようにして得られたバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んだプラスミドの一例がpICR3である。このプラスミドpICR3を保有するエシェリチア・コリC600-pICR3は、昭和59年2月14日付けて、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。その寄託番号は、FERMP-7447である。また、サーモアクチノミセス・インターミディアス (*Thermoactinomyces intermedius*) 由来のロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んだプラスミドの一例がpULDH2である。このプラスミドpULDH2を保有する微生物としてエシェリチア・コリJM109/pULDH2が挙げられる。また、サーモアクチノミセス・インターミディアス (*Thermoactinomyces intermedius*) 由来のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んだプラスミドの一例がpKPDH1である。このプラスミドpKPDH1を保有

する微生物としてエシェリチア・コリJM109/pKPDH1が挙げられる。

【0013】本発明の組換えプラスミドは、上記のようにして得られたNAD⁺依存性キ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とNADH依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを、大腸菌を宿主とすることが可能なプラスミド、例えばpUC19(宝酒造社製)、pBluescript KS(+) (ストラタジーン社製)等に、tacプロモーターの下流に同一転写方向で直列になるように連結することにより得ることができる。

【0014】連結する方法としては、例えばモレキュラー・クローニング第二版(コールドスプリングハーバー出版社、1989年)に記載されているように、これらの酵素をコードする遺伝子断片、プラスミド及びtacプロモーターを制限酵素で消化し、次いでDNAリガーゼを用いて結合させればよい。ここで用いられるtacプロモーターとしては、市販のもの(例えば、ファルマシア社製)を用いればよく、制限酵素としては、HindIII、PstI、SalI等が挙げられる。また、DNAリガーゼとしては、T4ファージ感染大腸菌由来T4DNAリガーゼが好適に用いられる。

【0015】このようにして作製された組換えプラスミドの具体例としては、プラスミドpUC19にマイコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) 由来のキ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とサーモアクチノミセス・インターミディアス (*Thermoactinomyces intermedius*) 由来のロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む組換えプラスミドpFDH/LeuDH、プラスミドpUC19にマイコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) 由来のキ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む組換えプラスミドpFDH/AlaDH、プラスミドpUC19にマイコバクテリウム・バッカエ (*Mycobacterium vaccae*) 由来のキ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とサーモアクチノミセス・インターミディアス (*Thermoactinomyces intermedius*) 由来のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む組換えプラスミドpFDH/PheDHが挙げられる。

【0016】このようにして得られた組換えプラスミドを用いて大腸菌を形質転換する方法としては、例えばジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー [J. Mol. Biol., 53巻, 159-162頁(1970)]に記載の方法に従って、0°C付近の温度で塩化カルシウム処理した大腸菌に組換えプラスミドを接觸、導入する方法が挙げられる。このときに用いられる大腸菌としては、JM109株、DH5a株等が挙げられる。

【0017】このようにして形質転換された大腸菌から、本発明の組換えプラスミドを保有する形質転換体を選択する方法としては、例えばモレキュラー・クローニ

ング第二版（コールドスプリングハーバー出版社、1989年）に記載の方法に従って、プラスミドを抽出した後、各種制限酵素による切断パターンを調べることにより選択することができる。

【0018】このようにして本発明の組換えプラスミドによって形質転換された大腸菌の具体例として、組換えプラスミドpFDH/LeuDHを保有するエシェリチア・コリJM109(pFDH/LeuDH) (FERM P-15350)、組換えプラスミドpFDH/AlaDHを保有するエシェリチア・コリJM109 (pFDH/AlaDH) (FERM P-15351)、組換えプラスミドpFDH/PheDHを保有するエシェリチア・コリJM109 (pFDH/PheDH) (FERM P-15354)が挙げられる。これらの大腸菌は平成7年12月18日付けて、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0019】このようにして形質転換された大腸菌を培養するための栄養培地としては、一般の大腸菌の培養に使用される培地を用いることができ、例えば、炭素源としては、グルコース、グリセロール、フルクトース、シュークロース、マルトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の炭水化物、エタノール等のアルコール類が挙げられ、窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の各種無機あるいは有機アンモニウム塩類、尿素等の無機含窒素化合物、グルタミン酸等のアミノ酸類、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、コーンスチーブリカー等の含窒素天然栄養源等を用いることができる。また、無機非金属又は金属塩として、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸第一鉄、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、硫酸マンガン等を用いることができる。

【0020】さらに、ビオチン、チアミン等のビタミン類を必要に応じて添加してもよく、プラスミドの安定保持のためにアンピシリン等の抗性物質を少量添加することが好ましい。また、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を添加することにより、宿種大腸菌内のラクトースリプレッサー制御下にある目的遺伝子産物の発現を誘導することができる。

【0021】本発明のアミノ酸又はその誘導体の製造方法としては、上記のようにして形質転換された大腸菌を、上記のような栄養培地で培養し、大腸菌内にギ酸デヒドロゲナーゼ及びアミノ酸デヒドロゲナーゼを生産させた培養物の存在下に、α-ケト酸とギ酸アンモニウムとを反応させるが、このときに培養物そのものばかりに、培養物から菌体を回収し、超音波処理、リゾチーム処理、ガラスピーブ等により菌体を破碎して得られた破碎液であってもよい。

【0022】このときの反応液中のα-ケト酸の濃度としては、0.5～5.0重量%が好ましく、特に1.0

～2.0重量%が好ましい。また、ギ酸アンモニウムの濃度としては、1.0～5.0重量%が好ましく、特に2.5～3.5重量%が好ましい。また、培養液の添加量としては、アミノ酸デヒドロゲナーゼ及びギ酸デヒドロゲナーゼの酵素量がそれぞれ1ユニット/ミリリットル以上になるように添加することが好ましい。

【0023】反応条件としては、ギ酸デヒドロゲナーゼ反応の最適条件と、アミノ酸デヒドロゲナーゼ反応の最適条件を考慮して選択すればよい。例えば、L-ロイシンを製造する反応においては、pHとしては5.0～9.0であることが好ましく、特に7.0～8.0であることが好ましく、通常はこの範囲のpHの緩衝液が用いられる。また、反応温度としては、20～60°Cで行なうことが好ましく、特に25～45°Cで行なうことが好ましい。また、反応時間としては25°Cで反応を行う場合、6～24時間が好ましく、特に8～16時間が好ましい。

【0024】このようにして得られた反応物からアミノ酸又はその誘導体を回収する方法としては、熱処理、遠心分離等により核酸、蛋白等を除去した後、活性炭処理、イオン交換樹脂等の公知の方法により回収することができる。

【0025】

【実施例】次に、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、本発明において、制限酵素は全て宝酒造社製のものを用いた。

参考例1

(a)マイコバクテリウム・バッカエの全染色体DNAの抽出

栄養培地（組成：酵母エキス30g、肉エキス5g、グルコース5g、グリセロール15gを蒸留水に溶解して1リットルとした。pH7.0）100ミリリットルを500ミリリットル容三角フラスコに分注し、121°Cで20分間加圧滅菌した後、マイコバクテリウム・バッカエN10株を1白金耳植菌して30°Cで24時間振とう攪はん培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を収集し、得られた菌体を、10mg/ミリリットルのリゾチームを含有する緩衝液（組成：10mMのNaCl、20mMのトリス塩酸、1mMのEDTA・2Na、pH8.0）20ミリリットルに懸濁した。これにプロテイナーゼKを最終濃度が100mg/ミリリットルとなるように添加し、37°Cで1時間インキュベートした後、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5% (W/V) となるように添加し、50°Cで6時間インキュベートして溶菌させて溶菌液を得た。この溶菌液に等量のフェノール/クロロホルム(1:1, V/V)混合液を添加し、室温で10分間緩やかに振とうした後、全量を滅菌済み遠心管に移し、10～12°Cで20分間、5000×gの遠心分離を行って上清画分を得た。得られた上清画分を分取し、3Mの酢酸ナトリウムを最

終濃度が0.3Mとなるように添加した後、これに2倍量のエタノールを穏やかに添加し、溶液の水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒で巻取りってDNAを得た。得られたDNAを70% (V/V) エタノールで洗浄した後、風乾した。このDNAに1mMのEDTA・2Naを含む10mMのトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を5ミリリットル添加して4°Cで一晩静置した後、以下の実験に供した。

【0026】(b) ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする構造遺伝子の一部DNA断片の増幅

バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ
コミュニケーション (Biochemical and Biophysical Research Communication) Vol.192, No.2, 976-981 (1993)] に記載のシュードモナス (Pseudomonas sp.) 101株由来のギ酸デヒドロゲナーゼを構成するアミノ酸配列を始め、各種菌株由来のギ酸デヒドロゲナーゼを構成するアミノ酸配列から、相同かつ種を超えて保存されている領域に基づき、配列番号3及び配列番号4に示す2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、DNA/RNAシンセサイザー [394型、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製、米国] を用いて合成した。

【0027】このプライマーを用い、上記(a)で調製したマイコバクテリウム・バッカエN10株の染色体DNAを鋳型にしてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction : PCR) 法によりギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の一部DNA断片の増幅を行った。PCRの条件としては、500ミリリットル容エッペンドルフ・チューブに、染色体DNA 1.0ng、オリゴ・ヌクレオチド・プライマー各1mg、20mMのトリス塩酸 (pH 8.3)、1.5mMのMgCl₂、25mMのKC1、0.05% (W/V) のツイーン20、100mg/ミリリットルの牛胎児血清アルブミン、各々50mMのdATP、dGTP、dTTP及びdCTP、2.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を総量で100ミリリットル添加し、サーマル・サイクラ (パーキン・エルマー (Perkin-Elmer) 社製) を用いて、DNA変性95°Cで1分、プライマーのアニーリング65°Cで2分、プライマーの伸長反応72°Cで2分を1サイクルとして、30サイクルの増幅を行い、386塩基対のギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の一部DNA断片を得た。

【0028】(c) ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の単離

上記(b)で得られたギ酸デヒドロゲナーゼをコードする構造遺伝子の一部DNA断片の塩基配列 (配列番号2) を決定した後、この一部DNA断片をプローブとして、上記(a)で得られたマイコバクテリウム・バッカエN10株の染色体DNAを制限酵素Hind III及びPst Iで処理したものに対してザンハイブリダイゼーション

を行い、ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を得た (約2~3Kbp)。得られたDNA断片をプラスミドpUC119 (宝酒造社製) に挿入し、得られたプラスミドを用いて大腸菌JM109 株を形質転換して、ライプラリーを作製した後、配列番号4で示されるプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、上記ライプラリーから、マイコバクテリウム・バッカエN10株由来のギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含有するクローニングエシェリチア・コリJM109 (pFDH) (FERM P-15352) を取得した。

【0029】(d) クローニング断片の塩基配列の決定

上記(c)で取得したエシェリチア・コリJM109 (pFDH) よりプラスミドpFDHを回収し、常法に従いクローニング断片の塩基配列を決定した (配列番号1)。さらに求められた塩基配列からアミノ酸配列を推定した。この結果、マイコバクテリウム・バッカエN10株由来のギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子は約1200塩基からなり、400個のアミノ酸がコードされていた。

【0030】実施例1

(a) 組換えプラスミドpFDH/LeuDHの作製

参考例1で得られたギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の塩基配列 (配列番号1) に基づき、5'末端側の端に制限酵素BamH Iの認識配列タグを、3'末端側の端に制限酵素Sph Iの認識配列タグを付与したオリゴ・ヌクレオチド・プライマー (配列番号5と6) を設計し、pFDHを鋳型にしてPCR法によりマイコバクテリウム・バッカエN10株由来のシャイン・ダルガーノ配列 (SD配列) に続くギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の増幅を行った。

【0031】また、ロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片としては、ヨーロピアンジャーナル・オブ・バイオケミストリー [(European Journal of Biochemistry) vol.222, 305-312, (1994)] に記載のロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の分離法に基づき、サーモアクチノミセス・インターミディアスから分離した遺伝子断片が挿入されたプラスミドベクターpULDH2を用い、5'末端側の端に制限酵素Sph Iの認識配列タグを、3'末端側の端に制限酵素EcoR Iの認識配列タグを付与したオリゴ・ヌクレオチド・プライマー (配列番号7と8) を設計し、pULDH2を鋳型にし、PCR法によサーモアクチノミセス・インターミディアス由来のシャイン・ダルガーノ配列 (SD配列) に続くロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の増幅を行った。なお、pULDH2は、エシェリチア・コリJM109/pULDH2をTE-シュークロース緩衝液 (200mg/ミリリットルのシューカロースと20mMのEDTAを含む0.05Mのトリス緩衝液、pH 8.0) 80ミリリットルに懸濁し、さらに5mg/ミリリットルのリゾチームを含むTE-シューカロース緩衝液8ミリリットル、5MのNaCl 28ミリリット

ル、4.0 mg／ミリリットルのSDS溶液を加えて37°Cで2時間反応させた後、遠心分離して調製した。

【0032】次に、制限酵素Hind III、EcoR I処理を行ったプラスミドベクターpUC19(宝造社製)、制限酵素Hind III、BamH I処理を行ったtacプロモーター(ファルマシア社製)に、上記の方法で得られたギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片及びロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をそれぞれ制限酵素BamH I、Sph I及び制限酵素Sph I、EcoR Iで処理したものと混合し、これに6.6 mMのMgCl₂、1.0 mMのDTT及び6.6 μMのATPを含むトリス緩衝液(pH 7.6)を20マイクロリットル加え、さらにT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)350ユーニットを加えてを18°Cで16時間反応させてDNA鎖の連結反応を行い、組換えプラスミドpFDH/LeuDHを作製した。この組換えプラスミドpFDH/LeuDHの開裂地図を図1に示す。

【0033】(b) 組換え大腸菌JM109(pFDH/LeuDH)の作製

上記(a)で得たプラスミドpFDH/LeuDHを用いて大腸菌JM109株の形質転換を行った。すなわち、ジャーナル・オブ・モレキュラバイオロジー[J. Mol. Biol., 53巻、159-162頁(1970)]に記載の方法に従って、0°C付近の温度で塩化カルシウム処理した大腸菌JM109に、上記(a)の方法で得られたプラスミドpFDH/LeuDHを加えて形質転換を行なった後、アンピシリン50 μg／ミリリットルを含むLB培地〔組成：バクトトリプトン10 g、酵母エキス5 g、NaCl 1.0 gを蒸留水に溶解して1リットルとする(pH 7.2)〕で培養して、形質転換株を選択した。

【0034】得られた形質転換株から、上記の方法に従ってプラスミドを抽出した後、各種制限酵素を用いて処理し、アガロースゲル電気泳動により制限酵素処理組換えプラスミドを電気泳動した。電気泳動後、切断パターンを比較して、プラスミドpFDH/LeuDHで形質転換された大腸菌を選択し、これをエシェリチア・コリJM109(pFDH/LeuDH)と命名した(FERM P-15350)。

【0035】実施例2

5'末端側の端に制限酵素Sph Iの認識配列タグを、3'末端側の端に制限酵素EcoR Iの認識配列タグを付与したオリゴ・ヌクレオチド・プライマー(配列番号9と10)を設計し、実施例1と同様にしてエシェリチア・コリC600-pICR3(FERM P-7447)から調製したpICR3を錠型にしてアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をPCR法により増幅した。次に、実施例1で得られた組換えプラスミドpFDH/LeuDHに制限酵素Sph I、EcoR I処理を施してロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を除いた組換えプラスミドに、上記のアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNAを制限酵素Sph

I、EcoR Iで処理したものを混合し、実施例1と同様にしてDNA鎖の連結反応を行い、組換えプラスミドpFDH/AlaDHを作製した。この組換えプラスミドpFDH/AlaDHの開裂地図を図2に示す。この組換えプラスミドpFDH/AlaDHを実施例1と同様にして大腸菌JM109に導入し、エシェリチア・コリJM109(pFDH/AlaDH)(FERM P-15351)を作製した。

【0036】実施例3

アラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をフェニルアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に代える以外は実施例2と同様にして組換えプラスミドpFDH/PheDH及びこれにより形質転換されたエシェリチア・コリJM109(pFDH/PheDH)(FERM P-15354)を作製した。なお、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片としては、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー[Journal of Biochemistry] vol. 109, 371-376, (1991)に記載のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の分離法に基づき、サーモアクトノミセス・インターミディアスから分離した遺伝子断片が挿入されたプラスミドベクターpKPDH1を錠型として、5'末端側の端に制限酵素Sph Iの認識配列タグを、3'末端側の端に制限酵素EcoR Iの認識配列タグを付与したオリゴ・ヌクレオチド・プライマー(配列番号11と12)を用いてPCR法により増幅したフェニルアラニンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を用いた。

【0037】実施例4

実施例1で作製したエシェリチア・コリJM109(pFDH/LeuDH)を50 μg／ミリリットルを含むLB培地10ミリリットルに植菌し、37°Cで一晩種培養し、そのうちの100マイクロリットルを50 mg／ミリリットルのアンピシリンを含むLB培地10ミリリットルに植菌し、37°Cで660 nmの吸光度が0.3になるまで振とう培養した後、IPTGを1 mMとなるように添加して遺伝子発現の誘導をかけ、さらに37°Cで12時間振とう培養して培養液を得た。この培養液を遠心分離して菌体を回収した後、0.1 Mのリン酸緩衝液(pH 7.0)で洗浄し、同緩衝液に再懸濁した後、超音波により菌体を破碎して菌体破碎液を得た。この菌体破碎液のギ酸デヒドロゲナーゼ、ロイシンデヒドロゲナーゼ各酵素活性を測定したところ、可溶化蛋白1 mgあたり、それぞれ1.30ユーニット、1.1.2ユーニットの活性を示し、酵素蛋白発現量は総蛋白あたりそれぞれ4~8%と良好な発現を示していた。

【0038】実施例5

実施例4と同様の方法で培養して得られたエシェリチア・コリJM109(pFDH/LeuDH)の菌体破碎液を用いて、ギ酸デヒドロゲナーゼとロイシンデヒドロゲナーゼの共役反応によるロイシンの生成反応を以下のようにして行つ

た。すなわち、10 mMの α -ケトカブロン酸及び50 mMのギ酸アンモニウムを含む500 mMのアンモニア緩衝液(pH 7.5)100ミリリットルにエシェリチア・コリJM109(pFDH/LeuDH)の菌体破碎液をギ酸デヒドロゲナーゼ1ユニット/ミリリットル、ロイシンデヒドロゲナーゼ8.6ユニット/ミリリットルとなるように加えて、25°Cで8時間、攪拌しながら反応させてL-ロイシンを生成させた。

【0039】この間に生成したL-ロイシンをアミノ酸自動分析装置(アプライド・バイオシステムズ社製)及び高速液体クロマトグラフィー(ウォーターズ社製)を用いて定性及び定量した。その結果を図4に示す。図4は、本発明のギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを含有するプラスミドで形質転換された大腸菌の培養物を用いてL-ロイシンを製造したときの結果を示す図であり、縦軸にL-ロイシンの生成量を、横軸に反応時間を示している。図4から明らかなように、本発明のギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを含有するプラスミドで形質転換された大腸菌の培養物を用いてギ酸デヒドロゲナーゼとロイシンデヒドロゲナーゼの共役反応を行うことにより、 α -ケトイソカブロン酸からL-ロイシンを効率よく製造することができた。

【0040】実施例6

実施例2で作製したエシェリチア・コリJM109(pFDH/AlaDH)を50 μg/ミリリットルを含むLB培地10ミリリットルに植菌し、37°Cで一晩種培養し、そのうちの100マイクロリットルを50 μg/ミリリットルのアンピシリンを含むLB培地10ミリリットルに植菌し、37°Cで660 nmの吸光度が0.3になるまで振とう培養した後、IPTGを1 mMとなるように添加して遺伝子発現の誘導をかけ、さらに37°Cで12時間振とう培養して培養液を得た。この培養液を遠心分離して菌体を回収した後、0.1Mのリン酸緩衝液(pH 7.0)で洗浄した。さらに同緩衝液に再懸濁した後、超音波により菌体を破碎して菌体破碎液を得た。この菌体破碎液のギ酸デヒドロゲナーゼ、アラニンデヒドロゲナーゼ各酵素活性を測定したところ、可溶化蛋白1 mgあたり、それぞれ1.25ユニット、8.2ユニットの活性を示した。

【0041】実施例7

実施例6と同様の方法で培養して得られたエシェリチア・コリJM109(pFDH/AlaDH)の菌体破碎液を用いて、ギ酸デヒドロゲナーゼとアラニンデヒドロゲナーゼの共役反応によるアラニンの生成反応を以下のようにして行った。すなわち、10 mMのビルビン酸及び50 mMのギ酸アンモニウムを含む500 mMのアンモニア緩衝液(pH 7.5)100ミリリットルにエシェリチア・コリJM109(pFDH/AlaDH)の菌体破碎液をギ酸デヒドロゲナーゼ1ユニット/ミリリットル、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ6.5ユニット/ミリリットルとなるように加えて、25°Cで8時間、攪拌しながら反応させてL-フェニルアラニンを生成させた。

ギ酸デヒドロゲナーゼ6.6ユニット/ミリリットルとなるように加えて、25°Cで8時間、攪拌しながら反応させてL-アラニンを生成させた。

【0042】この間に生成したL-アラニンをアミノ酸自動分析装置(アプライド・バイオシステムズ社製)及び高速液体クロマトグラフィー(ウォーターズ社製)を用いて定性及び定量した。その結果を図5に示す。図5は、本発明のギ酸デヒドロゲナーゼとアラニンデヒドロゲナーゼの遺伝子を含有するプラスミドで形質転換された大腸菌の培養物を用いてL-アラニンを製造したときの結果を示す図であり、縦軸にL-アラニンの生成量を、横軸に反応時間を示している。図5からわかるように、本発明のギ酸デヒドロゲナーゼとアラニンデヒドロゲナーゼの遺伝子を含有するプラスミドで形質転換された大腸菌の培養物を用いてギ酸デヒドロゲナーゼとアラニンデヒドロゲナーゼの共役反応を行うことにより、ビルビン酸からL-アラニンを効率よく製造することができる。

【0043】実施例8

実施例3で作製したエシェリチア・コリJM109(pFDH/PheDH)を50 μg/ミリリットルを含むLB培地10ミリリットルに植菌し、37°Cで一晩種培養し、そのうちの100マイクロリットルを50 μg/ミリリットルのアンピシリンを含むLB培地10ミリリットルに植菌し、37°Cで660 nmの吸光度が0.3になるまで振とう培養した後、IPTGを1 mMとなるように添加して遺伝子発現の誘導をかけ、さらに37°Cで12時間振とう培養して培養液を得た。この培養液を遠心分離して菌体を回収した後、0.1Mのリン酸緩衝液(pH 7.0)で洗浄した。さらに同緩衝液に再懸濁した後、超音波により菌体を破碎して菌体破碎液を得た。この菌体破碎液のギ酸デヒドロゲナーゼ、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ各酵素活性を測定したところ、可溶化蛋白1 mgあたり、それぞれ1.20ユニット、7.8ユニットの活性を示した。

【0044】実施例9

実施例8と同様の方法で培養して得られたエシェリチア・コリJM109(pFDH/PheDH)の菌体破碎液を用いて、ギ酸デヒドロゲナーゼとフェニルアラニンデヒドロゲナーゼの共役反応によるフェニルアラニンの生成反応を以下のようにして行った。すなわち、10 mMのフェニルビルビン酸及び50 mMのギ酸アンモニウムを含む500 mMのアンモニア緩衝液(pH 7.5)100ミリリットルにエシェリチア・コリJM109(pFDH/PheDH)の菌体破碎液をギ酸デヒドロゲナーゼ1ユニット/ミリリットル、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ6.5ユニット/ミリリットルとなるように加えて、25°Cで8時間、攪拌しながら反応させてL-フェニルアラニンを生成させた。

【0045】この間に生成したL-フェニルアラニンをアミノ酸自動分析装置（アプライド・バイオシステムズ社製）及び高速液体クロマトグラフィー（ウォーターズ社製）を用いて定性及び定量した。その結果を図6に示す。図6は、本発明のギ酸デヒドロゲナーゼとフェニルアラニンデヒドロゲナーゼの遺伝子を含有するプラスミドで形質転換された大腸菌の培養物を用いてL-フェニルアラニンを製造したときの結果を示す図であり、縦軸にL-フェニルアラニンの生成量を、横軸に反応時間を示している。図6からわかるように、本発明のギ酸デヒドロゲナーゼとフェニルアラニンデヒドロゲナーゼの遺伝子を含有するプラスミドで形質転換された大腸菌の培養物を用いてギ酸デヒドロゲナーゼとフェニルアラニンデヒドロゲナーゼの共役反応を行うことにより、フェニルピルビン酸からL-フェニルアラニンを効率よく製造することができる。

【0046】実施例10

実施例4と同様の方法で培養して得られたエシェリチア・コリJM109(pFDH/LeuDH)の菌体破碎液を用いて、ギ酸

デヒドロゲナーゼとロイシンデヒドロゲナーゼの共役反応による表1に示す各種アミノ酸及びその誘導体の生成反応を以下のようにして行った。すなわち、10 mMの各種 α -ケト酸及び50 mMのギ酸アンモニウムを含む500 mMのアンモニア緩衝液（pH 7.5）100ミリリットルにエシェリチア・コリJM109(pFDH/LeuDH)の菌体破碎液をギ酸デヒドロゲナーゼ 1ユニット/ミリリットル、ロイシンデヒドロゲナーゼ 8.6ユニット/ミリリットルとなるように加えて、25°Cで12時間、攪拌しながら反応させて表1に示すアミノ酸及びその誘導体を生成させた。

【0047】この間に生成したアミノ酸及びその誘導体をアミノ酸自動分析装置（アプライド・バイオシステムズ社製）及び高速液体クロマトグラフィー（ウォーターズ社製）を用いて定性及び定量した。その結果を表1に示す。

【0048】

【表1】

原 料	アミノ酸又はその誘導体	収率(%)
α -ケトカプロン酸	L-ノルロイシン	9.5
α -ケトイソバケル酸	L-バリン	9.5
α -ケトバケル酸	L-ノルバリン	9.5
α -ケトブチル酸	L- α -アミノブチル酸	8.8
テチオメチルブチル- α -ケト酸	L-メチオニン	8.8

【0049】表1から明らかなように、本発明のギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とロイシンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子とを含有するプラスミドによって形質転換された大腸菌の培養物を用いてギ酸デヒドロゲナーゼとロイシンデヒドロゲナーゼの共役反応を行うことにより、各種 α -ケト酸から各種アミノ酸及びその誘導体を効率よく製造することができた。

【0050】

【発明の効果】本発明の組換えプラスミド、それにより形質転換された大腸菌及びその培養物は、アミノ酸及びその誘導体を容易に製造するために用いることができる。また、本発明の方法によれば、アミノ酸及びその誘導体を容易に効率よく製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の組換えプラスミドpFDH/LeuDHの開裂地図を示す図である。

【図2】本発明の組換えプラスミドpFDH/AlaDHの開裂地図を示す図である。

【図3】本発明の組換えプラスミドpFDH/PheDHの開裂地図を示す図である。

【図4】本発明の組換えプラスミドpFDH/LeuDHで形質転換された大腸菌の培養物を用いてL-ロイシンを製造し

たときの、L-ロイシンの生成量の経時変化を示す図である。

【図5】本発明の組換えプラスミドpFDH/AlaDHで形質転換された大腸菌の培養物を用いてL-アラニンを製造したときの、L-アラニンの生成量の経時変化を示す図である。

【図6】本発明の組換えプラスミドpFDH/PheDHで形質転換された大腸菌の培養物を用いてL-フェニルアラニンを製造したときの、L-フェニルアラニンの生成量の経時変化を示す図である。

【配列表】

配列番号：1
配列の長さ：1203

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

微生物名：マイコバクテリウム・バッカエ

株名：N10

配列の特長

特徴を表す記号：CDS

特徴を決定した方法：P

配列

ATG GCA AAG GTC CTG TGC GTT CTT TAC GAT GAT CCG GTC GAC GGC TAC Met ala lys val leu cys val leu tyr asp asp pro val asp gly tyr	48
CCG AAG ACC TAT GCC CGC GAC GAT CTT CCG AAG ATC GAC CAC TAT CCG pro lys thr tyr ala arg asp asp leu pro lys ile asp his lys ala	96
GGC GGC CAG ATC TTG CCG ACG CCG AAG GCC ATC GAC TTC ACG CCC GGG ile asp phe thr pro gly gln leu leu gly ser val ser gly glu leu	144
CAG TTG CTC GGC TCC GTC TCC GGC GAG CTC GGC CTG CGC GAA TAT CTC tyr pro gly gly gln ile leu pro thr pro gly leu arg glu tyr leu	192
GAA TCC AAC GGC CAC ACC CTG GTC GTG ACC TCC GAC AAG GAC GGC CCC glu ser asn gly his thr leu val val thr ser asp lys asp gly pro	240
GAC TCG GTG TTC GAG CGC GAG CTG GTC GAT GCG GAT GTC GTC ATC TCC asp ser val phe glu arg glu leu val asp ala asp val val ile ser	288
CAG CCC TTC TGG CCG GCC TAT CTG ACG CCC GAG CGC ATC GCC AAG GCC gln pro phe trp pro ala tyr leu thr pro glu arg ile ala lys ala	336
AAG AAC CTG AAG CTC GCG CTC ACC GCC GGC ATC GGT TCC GAC CAC GTC lys asn leu lys leu ala leu thr ala gly ile gly ser asp his val	384
GAT CTT CAG TCG GCT ATC GAC CGC AAC GTC ACC GTG GCG GAA GTC ACC asp leu gln ser ala ile asp arg asn val thr val ala glu val thr	432
TAC TGC AAC TCG ATC AGC GTC GCC GAG CAT GTG GTG ATG ATG ATC CTG tyr cys asn ser ile ser ser leu val arg asn tyr leu pro ser his	480
TCG CTG GTG CGC AAC TAT CTG CCC TCG CAC GAA TGG GCG CGG AAG GGC glu trp ala arg lys gly gly trp val ala glu his val val met met	528
GGC TGG AAC ATC GCC GAC TGC GTC TCC CAC GCC TAC GAC CTC GAG GCG ile leu asn ile ala asp cys val ser his ala tyr asp leu glu ala	576
ATG CAT GTC GGC ACC GTG GCC GCC GGC CGC ATC GGT CTC GCG GTG CTG met his val gly thr val ala ala gly arg ile gly leu ala val leu	624
CGC CGT CTG GCG CCG TTC GAC GTG CAC CTG CAC TAC ACC GAC CGT CAC arg arg leu ala pro phe asp val his leu his tyr thr asp arg his	672
CGC CTG CCG GAA TCG GTC GAG AAG GAG CTC AAC CTC ACC TGG CAC GCG arg leu pro glu ser val glu lys glu leu asn leu thr trp his ala	720
ACC CGC GAG GAC ATG TAT CCG GTT TGC GAC GTG GTG ACG CTG AAC TGC thr arg glu asp met tyr pro val cys asp val val thr leu asn cys	768

CCG CTG CAC CCC GAA ACC GAG CAC ATG ATC AAT GAC GAG ACG CTG AAG pro leu his pro glu thr glu his met ile asn asp glu thr leu lys	816
CTG TTC AAG CGT GGC GCC TAC ATC GTC AAC ACC GCC CGC GGC AAG CTG leu phe lys arg gly ala tyr ile val asn thr ala arg gly lys leu	864
TGC GAC CGC GAT GCC GTG GCA CGT GCG CTC GAA TCC GGC CGG CTG GCC cys asp arg asp ala val ala arg ala leu glu ser gly arg leu ala	912
GCG TAT GCC GGC GAC GTG TGG TTC CCG CAG CCG GCG CCG AAG GAC CAC gly tyr ala gly asp val trp phe pro gln pro ala pro lys asp his	960
CCC TGG CGG ACG ATG CCC TAT AAC GGC ATG ACC CCG CAC ATC TCC GGC pro trp arg thr met pro tyr asn gly met thr pro his ile ser gly	1008
ACC ACG CTG ACC GCG CAG GCG CGT TAT GCG GCG GGC ACC CGC GAG ATC thr thr leu thr ala gln ala arg tyr ala ala gly thr arg glu ile	1056
CTG GAG TGC TTC TAC GAG GGC CGT CCG ATC CGC GAC GAA TAC CTC ATC leu glu cys phe phe glu gly arg pro ile arg asp glu tyr leu ile	1104
GTG CAG GGC GGC GCT CTT GCC GGC ACC GGC GCG CAT TCC TAC TCG AAG val gln gly gly ala leu ala gly thr gly ala his ser tyr ser lys	1152
GGC AAT GCC ACC GGC GGT TCG GAA GAG GCC GCC AAG TTC AAG AAG GCG gly asn ala thr gly gly ser glu glu ala ala lys phe lys lys ala	1200
GTC TGA val *	1206

配列番号：2

配列の長さ：386

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

微生物名：マイコバクテリウム・バッカエ

株名：N 10

配列の特長

特徴を表す記号：CDS

特徴を決定した方法：P

配列

<u>GTGACCTCCG ACAAGGACGG</u> CCCCCACTCG GTGTTGAGC GCGAGCTGGT CGATGCGGAT GTCGTCATCT CCCAGCCCTT CTGGCCGGCC TATCTGACGC CCGAGCGCAT CGCCAAGGCC	60
AAGAACCTGA AGCTCGCGCT CACCGCCGGC ATCGGTTCCG ACCACGTCGA TCTTCAGTCG GCTATCGACC GCAACGTCAC CGTGGCGGAA GTCACCTACT GCAACTCGAT CAGCGTGGCC	120
GAGCATGTGG TGATGATGAT CCTGTCGCTG GTGCGCAACT ATCTGCCCTC GCACGAATGG GCGCGGAAGG GCGGCTGGAA CATCGCCGAC TGCCTCTCCC ACGCCTACGA CCTCGAGGCG	180
ATGCATGTCG GCACCGTGGC CGCCGG	240
	300
	360
	3

86

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

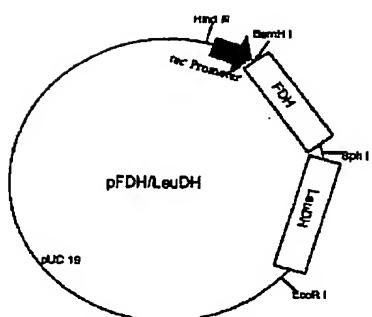
鎖の数：1本鎖

トポロジー：直線状

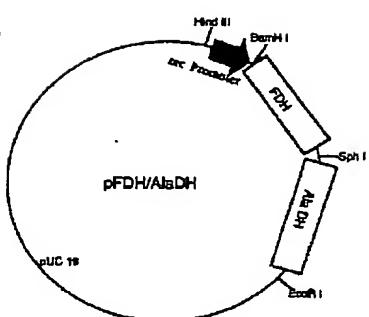
配列の種類：合成DNA

G TG (or C) ACG (or C) TCG (or C) G AC (or T) AAGGAG (or C) GG	20
配列番号：4	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：20	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
CCG (or C) GCG (or C) G (or C) CG (or C) A CG (or C) GTG (or C) CCG (or C) AC	20
配列番号：5	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：26	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GGATCCGGAG AGGAGATGCC CGCATG	26
配列番号：6	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：26	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GCATGCAGCG GAGAAGGCTC AGACCG	26
配列番号：7	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：39	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GCATGCGGAG GAAATGTAAT GGAATTGTTT AAATATATG	39
配列番号：8	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：27	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GAATTCTTT TATATTGCCG AAGCAC	27
配列番号：9	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：27	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GCATGCGGAG GAAATGTAAT GAAGATC	27
配列番号：10	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：25	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GAATTCTATGA TTTCATCCGT GCAAC	25
配列番号：11	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：26	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GCATGCGGAG GAAGCGAAGA TGCGCG	26
配列番号：12	鎖の数：1本鎖
配列の長さ：26	トポロジー：直線状
配列の型：核酸	配列の種類：合成DNA
配列	
GAATTCTTTC ATCAATGATT TTTACC	26

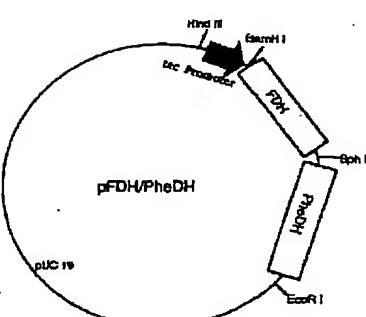
【図1】



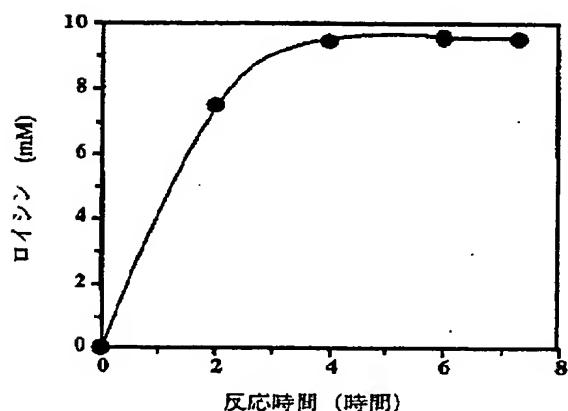
【図2】



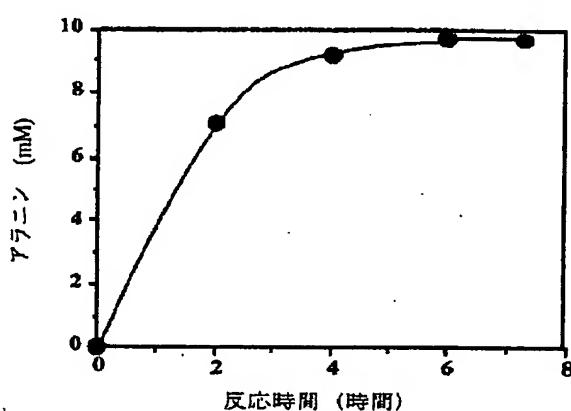
【図3】



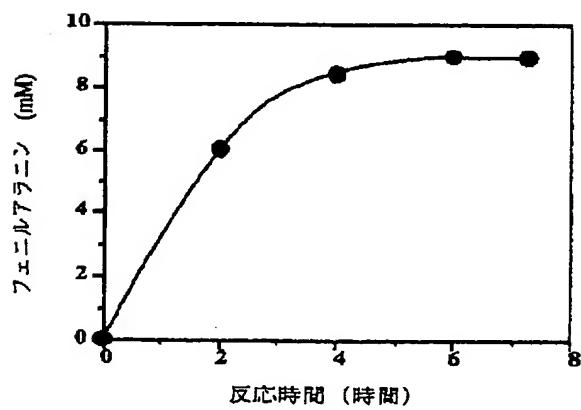
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6
C 12 P 13/06

13/08

識別記号 庁内整理番号

F I
C 12 P 13/06

13/08

技術表示箇所

B
A
D

13/12	13/12	A
13/22	13/22	C
//(C 1 2 N 1/21		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 N 9/04		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 P 13/04		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 P 13/06		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 P 13/08		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 P 13/12		
C 1 2 R 1:19)		
(C 1 2 P 13/22		
C 1 2 R 1:19)		